

00862.023526.



IFW

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
	:	Examiner: Not Yet Assigned
NOBUKO YAMAMOTO ET AL.)	
	:	Group Art Unit: Not Yet Assigned
Application No.: 10/810,550)	
	:	
Filed: March 29, 2004)	
	:	
For: INFECTIOUS ETIOLOGIC AGENT)	
DETECTION PROBE AND PROBE	:	
SET, CARRIER, AND GENETIC)	
SCREENING METHOD	:	June 21, 2004

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Sir:

In support of Applicants' claim for priority under 35 U.S.C. § 119, enclosed are certified copies of the following foreign applications:

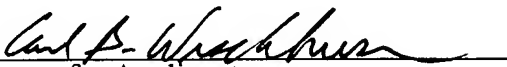
2003-099452 filed April 2, 2003;
2003-099453 filed April 2, 2003;
2003-099454 filed April 2, 2003;
2003-099455 filed April 2, 2003;
2003-099456 filed April 2, 2003;
2003-099457 filed April 2, 2003;
2003-099458 filed April 2, 2003;
2003-099459 filed April 2, 2003;
2003-099460 filed April 2, 2003;
2003-099461 filed April 2, 2003;
2003-099462 filed April 2, 2003;

2003-099463 filed April 2, 2003; and

2004-077045 filed March 17, 2004.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,


Attorney for Applicants

Registration No. 43,279

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200

NY_MAIN 432799v1

CFM03526
10/8/10, 550 US
CN

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 2 日
Date of Application:

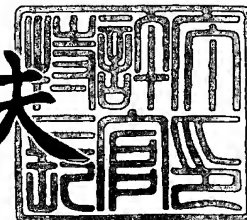
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 2
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 2]

出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 4 月 1 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 3 2 8 3 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 251759

【提出日】 平成15年 4月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 感染症起炎菌検出用プローブセット及び担体及び遺伝子
検査方法

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 山本 伸子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 川口 正浩

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 鈴木 智博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 吉井 裕人

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会
社内

【氏名】 石井 美絵

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 塚田 護

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 小倉 真哉

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100076428

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康德

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100112508

【弁理士】

【氏名又は名称】 高柳 司郎

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100115071

【弁理士】

【氏名又は名称】 大塚 康弘

【電話番号】 03-5276-3241

【選任した代理人】

【識別番号】 100116894

【弁理士】

【氏名又は名称】 木村 秀二

【電話番号】 03-5276-3241

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003458

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102485

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 感染症起炎菌検出用プローブセット及び担体及び遺伝子検査方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、下記第1群乃至第10群のうちの複数群に含まれる5'末端から3'末端方向への塩基配列及びそれらの相補鎖配列より選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含むことを特徴とする感染症起炎菌検出用プローブセット。

第1群

- (1) 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3'
- (2) 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'
- (3) 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3'
- (4) 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'
- (5) 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'
- (6) 5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'
- (7) 5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'
- (8) 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'
- (9) 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'

第2群

- (1) 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'
- (2) 5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACT 3'
- (3) 5' TAAGTAACTATGCACGTCTTGACGGT 3'
- (4) 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCC 3'
- (5) 5' AGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTC 3'
- (6) 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'
- (7) 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTTGG 3'

第3群

- (1) 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'

- (2)5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'
- (3)5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGCAG 3'
- (4)5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'
- (5)5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'
- (6)5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'
- (7)5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'

第 4 群

- (1)5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'
- (2)5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGA 3'
- (3)5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAAT 3'
- (4)5' TTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'
- (5)5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3'
- (6)5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'

第 5 群

- (1)5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'
- (2)5' TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC 3'
- (3)5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'
- (4)5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTTC 3'
- (5)5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'
- (6)5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'
- (7)5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'
- (8)5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'

第 6 群

- (1)5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'
- (2)5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'
- (3)5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3'
- (4)5' ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGA 3'
- (5)5' TTATCCTTTGTTGCAGCTTCGGCC 3'
- (6)5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'

第 7 群

- (1)5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'
- (2)5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3'
- (3)5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3'
- (4)5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3'
- (5)5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTA ACT 3'
- (6)5' TAGACCCTTTCCGGGGTTTAGTGC 3'
- (7)5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3'

第 8 群

- (1)5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'
- (2)5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'
- (3)5' CTTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'
- (4)5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'
- (5)5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'
- (6)5' GGCGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3'
- (7)5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'
- (8)5' TATCGGAAGATGAAAGTGCGGGACT 3'

第 9 群

- (1)5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'
- (2)5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3'
- (3)5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3'
- (4)5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'
- (5)5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'
- (6)5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'
- (7)5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'

第 1 0 群

- (1)5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'
- (2)5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3'
- (3)5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'

(4) 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'

(5) 5' GGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCT 3'

(6) 5' CTCAACCGGGGAGGGTCATTGG 3'

(7) 5' TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 3'

【請求項 2】 請求項 1 に記載の感染症起炎菌検出用プローブセットに含まれるプローブが化学的に固定されていることを特徴とする担体。

【請求項 3】 請求項 2 に記載の担体を用いて感染症起炎菌遺伝子を検出することを特徴とする遺伝子検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、感染症疾患の原因菌の検出および同定に有用な感染症起因菌由来のプローブセットならびに担体、遺伝子検査方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、DNAチップ（またはDNAマイクロアレイともいう。以下同じ）を用いた遺伝子発現解析が創薬を初め種々の領域で行なわれている。それは、各種遺伝子セット（プローブ）が配置されたDNAマイクロアレイに、それぞれ異なった検体DNAを反応させ、各検体に存在するそれぞれの遺伝子量を比較して、各ステージで大量に存在する（発現量の高い）遺伝子、或いは逆に不活性化している（発現量の低い）遺伝子を分類し、機能と関連付けて解析するものである。

【0003】

感染症の起炎菌検査はその一例であり、江崎らは特許文献1において、DNAプローブとして染色体DNAが固定化されたDNAチップを用いる微生物同定法を提案している。この方法によれば、互いにGC含量の異なる複数の既知微生物由来の染色体DNAと、検体中の未知微生物由来の染色体DNAとを反応させ、生じたハイブリダイゼーション複合体を検出することで検体中の未知微生物を検出することが可能である。

【0004】

また、大野らは感染症の起炎菌検査のためのDNAチップに用いるプローブとして、特許文献2で制限酵素断片を利用した真菌の検出用プローブを、特許文献3で緑膿菌の検出用プローブを、特許文献4でEscherichia coli (エシェリキア コリ) 菌、klebsiella pneumoniae (クレブシエラ ニューモニエ) 菌ならびにEnterobacter cloacae (エンテロバクター クロアカエ) 菌の制限酵素断片を利用した検出用プローブをそれぞれ提案している。

【0005】

【特許文献1】

特開 2 0 0 1 - 2 9 9 3 9 6 号公報

【特許文献2】

特開平 6 - 1 3 3 7 9 8 号公報

【特許文献3】

特開平 1 0 - 3 0 4 8 9 6 号公報

【特許文献4】

特開平 1 0 - 3 0 4 8 9 7 号公報。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記従来技術に示したDNAチップは、染色体DNA或いは制限酵素断片等のDNAプローブを利用するものであり、いずれも微生物から直接取り出したDNAを材料としている。このため、一度に大量に調製することは困難であり、臨床診断用には適さないという問題があった。これは臨床診断用に用いるためには、安価で均質なDNAチップの大量生産が必要であり、このためにプローブ溶液として均質なDNAの大量調製が不可欠となってくるところ、DNAプローブでは、このような大量調製ができないからである。なお、DNAプローブであっても、PCR増幅反応を利用することで当該DNAを徐々に増加させていくことは可能であるが、PCR反応では、一度に大量調製することは困難であることから、臨床診断用に利用することは難しい。

【0007】

また、DNAプローブは塩基長が長いため、類似菌種間における菌種の同定が

困難であり、例えば感染症検出用には適さないという問題があった。これは、感染症の治療においては菌種の特特定とそれに応じた抗生剤の選択・投与が必要であり、このために感染症検出用プローブには、同種内の詳細な区別までは必要としないまでも（つまり同種内は一括検出でき）、類似する他の種の細菌は区別して検出できるような機能が求められるからである。一方、例えば特許文献4で示されているエシェリキア コリ菌、クレブシエラ ニューモニエ菌、エンテロバクター クロアカエ菌の制限酵素断片を用いたDNAチップでは、プローブの塩基長が長いために、これら3菌種相互間に交差反応が生じてしまい、類似する個々の菌を区別することができず、感染症検出に利用することは難しい。

【0008】

本発明は、上記に鑑みてなされたものであり、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プローブを提供することを目的とする。

【0009】

より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プローブセットを提供することを目的とするものである。

【0010】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プローブと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプローブセットを提供することを目的とする。

【0011】

また、これらの感染症検出用プローブと検体との反応を行なう為に、これらの感染症検出用プローブが固定された担体を提供することを目的とする。

【0012】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体を提供することを目的とする。

【0013】

【発明が解決するための手段】

上記の目的を達成するための本発明による感染症起炎菌検出用プローブセットは、

感染症起炎菌遺伝子を検出するための感染症起炎菌検出用プローブセットであって、下記第1群乃至第10群のうちの複数群に含まれる5'末端から3'末端方向への塩基配列及びそれらの相補鎖配列より選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドで形成される複数種類のプローブを含む。ここで、第1群乃至第10群の塩基配列群はそれぞれ、

第1群：配列番号1～9（相補鎖配列は配列番号79～87）、

第2群：配列番号10～16（相補鎖配列は配列番号88～94）、

第3群：配列番号17～23（相補鎖配列は配列番号95～101）、

第4群：配列番号24～29（相補鎖配列は配列番号102～107）、

第5群：配列番号30～37（相補鎖配列は配列番号108～115）、

第6群：配列番号38～43（相補鎖配列は配列番号116～121）、

第7群：配列番号44～50（相補鎖配列は配列番号122～128）、

第8群：配列番号51～58（相補鎖配列は配列番号129～136）、

第9群：配列番号59～65（相補鎖配列は配列番号137～143）、

第10群：配列番号66～72（相補鎖配列は配列番号144～150）である。

。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0015】

以下の実施形態では、感染症の起炎菌同定の為のオリゴヌクレオチドプローブ、より具体的には、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌のいずれか、或いは複数菌を検出する為のプローブが示される。すなわち、上記10種類の感染症起炎菌の遺伝子のうちの16s rRNA遺伝子配列を過不足なく検出するための核酸プローブセットが開示される。

【0016】

本実施形態によれば、上記感染症起炎菌の遺伝子の核酸配列を含む検査溶液と反応せしめるための上記オリゴヌクレオチドプローブは、第1群（配列番号1～9）、第2群（配列番号10～16）、第3群（配列番号17～23）、第4群（配列番号24～29）、第5群（配列番号30～37）、第6群（配列番号38～43）、第7群（配列番号44～50）、第8群（配列番号51～58）、第9群（配列番号59～65）、第10群（配列番号66～72）のうちの一つの群に属する1つの塩基配列からなる。ここで、第1群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは黄色ブドウ球菌を検出し、第2群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは表皮ブドウ球菌を検出し、第3群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは大腸菌を検出し、第4群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎桿菌を検出し、第5群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは緑膿菌を検出し、第6群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはセラチア菌を検出し、第7群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブは肺炎連鎖球菌を検出し、第8群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはインフルエンザ菌を検出し、第9群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロバクター クロアカエ菌を検出し、第10群から選択された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドプローブはエンテロコッカス・フェカリス菌を検出する。

なお、これらのプローブ配列の相補的な配列（上記第1群の相補的な配列は配列番号79～87、第2群の相補的な配列は配列番号88～94、第3群の相補的な配列は配列番号95～101、第4群の相補的な配列は配列番号102～107、第5群の相補的な配列は配列番号108～115、第6群の相補的な配列は配列番号116～121、第7群の相補的な配列は配列番号122～128、第8群の相補的な配列は配列番号129～136、第9群の相補的な配列は配列番号137～143、第10群の相補的な配列は配列番号144～150である）もまた、同じ機能を有するためにプローブ配列として有効である。

【0017】

各菌のプロープの設計は、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、当該菌に対し非常に特異性が高く、また、それぞれのプロープ塩基配列でばらつきがなく、十分なハイブリダイゼーション感度が期待できるように行なった。

【0018】

これらのオリゴヌクレオチドプロープは、担体上に結合された2種以上のプロープと検体とのハイブリダイゼーション反応において、安定なハイブリッド体を形成し、良好な結果を与えるように設計されている。

【0019】

さらに、本発明にかかる感染症検出用プロープが固定された担体は、オリゴヌクレオチドをBJプリンタを用いて吐出し、化学的に結合させることで作製することを特徴としている。これにより、従来法に比べ、プロープがはがれにくくなるうえ、感度が向上するという付随的な効果も得られる。つまり、従来から一般的に用いられるスタンフォード法と呼ばれるスタンピング法によりDNAチップを生成した場合（例えば、宝酒造は、がん疾患に関連するヒト由来既知遺伝子のcDNA断片をスポット或いはスタンプにより塗布することでDNAチップを生成している）、塗布したDNAがはがれやすいという欠点があった。また、従来のように、DNAチップ上で合成によりプロープを配置した場合（例えば、AffymetrixのDNAチップ等）は、各プロープ配列毎の合成収量が異なる為に、正確な評価ができないという欠点があった。本発明にかかる担体は、かかる点についても考慮して作製されており、従来に比べ安定に固定されはがれにくく、高感度と高精度の検出ができる点を特徴としている。以下、本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0020】

本実施形態のDNAチップが検査の対象とする検体としては、ヒト、家畜等の動物由来の血液、喀痰、胃液、膿分泌物、口腔内粘液等の体液、尿及び糞便のような排出物等細菌が存在すると思われるあらゆる物を対象とする。また、食中毒、汚染の対象となる食品、飲料水及び温泉水のような環境中の水等、細菌による汚染が引き起こされる可能性のある媒体全てが挙げられる。さらに、輸出入時における検疫等の動植物も検体としてその対象とする。

【0021】

また、本実施形態のDNAチップが対象とする検体としては、抽出した核酸そのものでも良いが、16s rRNA検出用に設計されたPCR反应用プライマーを用いて調製された増幅検体、或いはPCR増幅物を元にさらにPCR反応等を行なって調製された検体、PCR以外の増幅方法により調製された検体、可視化のために各種標識法により標識された検体等、いずれの調製法により調製された検体をも含む。

【0022】

また、本実施形態のDNAチップに用いられる担体は、ガラス基板、プラスチック基板、シリコンウェハー等の平面基板、凹凸のある三次元構造体、ビーズのような球状のもの、棒状、紐状、糸状のもの等あらゆるものを含む。さらに、その基板の表面をプローブDNAの固定化が可能ないように処理したものも含む。特に、表面に化学反応が可能となるように官能基を導入したものは、ハイブリダイゼーション反応の過程でプローブが安定に結合している為に、再現性の点で好ましい形態である。

【0023】

本発明に用いられる固定化方法としては、例えば、マレイミド基とチオール（-SH）基との組合わせを用いる例が挙げられる。即ち核酸プローブの末端にチオール（-SH）基を結合させておき、固相表面がマレイミド基を有するように処理しておくことで、固相表面に供給された核酸プローブのチオール基と固相表面のマレイミド基とが反応して核酸プローブを固定化する。

【0024】

マレイミド基の導入方法としては、まず、ガラス基板にアミノシランカップリング剤を反応させ、次にそのアミノ基とEMCS試薬（N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide : Dojin社製）との反応によりマレイミド基を導入する。DNAへのSH基の導入は、DNA自動合成機でDNAを合成する際に、5'-Thiol-ModifierC6（Glen Research社製）を用いることにより行なうことができる。

【0025】

固定化に利用する官能基の組合わせとしては、上記したチオール基とマレイミ

ド基の組合わせ以外にも、例えばエポキシ基（固相上）とアミノ基（核酸プローブ末端）の組合わせ等が挙げられる。また、各種シランカップリング剤による表面処理も有効であり、該シランカップリング剤により導入された官能基と反応可能な官能基を導入したオリゴヌクレオチドが用いられる。さらに、官能基を有する樹脂をコーティングする方法も利用可能である。

【0026】

以下、エンテロバクター クロアカエ菌を検出するための感染症起炎菌検出用プローブを用いた実施例により、更に詳細に説明するが、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌についても、以下の実施例で説明するのと同様の手法によりプローブセットの設計、生成ができるとともに、検査処理（ハイブリダイゼーション反応）を行なうことができる。

【0027】

【実施例】 1 Step PCR法を用いた微生物の検出

[1. プローブDNAの準備]

エンテロバクター クロアカエ株検出用プローブとして表1に示す核酸配列を設計した。具体的には、エンテロバクター クロアカエ菌の16s rRNAをコーディングしているゲノム部分より、以下に示したプローブ塩基配列を選んだ。これらのプローブ塩基配列群は、当該菌に対し非常に特異性が高く、十分かつそれぞれのプローブ塩基配列でばらつきのないハイブリダイゼーション感度が期待できるように設計されている（なお、表1に示す各プローブ塩基配列はこれに完全に一致したものに限定される必要はなく、該各プローブ塩基配列を含む20から30程度の塩基長を有するプローブ塩基配列も表1に示す各プローブ塩基配列に含まれるものとする。また、上述のように表に示した塩基配列の相補的な配列（相補鎖）を用いてもよい。なお、表1に示す塩基配列の相補的な塩基配列は配列番号137～143である）。

【0028】

[表1]

微生物名	Probe No.	配列番号	配列
Enterobacter cloacae	EC-1	59	5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'
	EC-2	60	5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3'
	EC-3	61	5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3'
	EC-4	62	5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'
	EC-5	63	5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'
	EC-6	64	5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'
	EC-7	65	5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'

【 0 0 2 9 】

表中に示したプローブは、DNAマイクロアレイに固定するための官能基として、合成後、定法に従って核酸の5'末端にチオール基を導入した。官能基の導入後、精製し、凍結乾燥した。凍結乾燥したプローブは、-30℃の冷凍庫に保存した。

【 0 0 3 0 】

[2. 検体増幅用PCRプライマーの準備]

起炎菌検出用の為の16s rRNA遺伝子（標的遺伝子）増幅用PCR Primerとして表2に示す核酸配列を設計した。具体的には、16s rRNAをコーディングしているゲノム部分を特異的に増幅するプローブセット、つまり約1500塩基長の16s rRNAコーディング領域の両端部分で、特異的な融解温度をできるだけ揃えたプライマーを設計した。なお、変異株や、ゲノム上に複数存在する16s rRNAコーディング領域も同時に増幅できるように複数種類のプライマーを設計した。

【 0 0 3 1 】

[表2]

	Primer No.	配列番号	配列
Forward Primer	F-1	73	5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3'
	F-2	74	5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3'
	F-3	75	5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3'
Reverse Primer	R-1	76	5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'
	R-2	77	5' ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3'
	R-3	78	5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCCTAC 3'

【 0 0 3 2 】

表中に示したPrimerは、合成後、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）により精製し、Forward Primerを3種、Reverse Primerを3種を混合し、それぞれのプライマー濃度が、最終濃度10pmol/ μ lとなるようにT E緩衝液に溶解した。

【 0 0 3 3 】

[3. エンテロバクター クロアカエ菌(Enterobacter_cloacae) Genome D N A（モデル検体）の抽出]

[3-1] 微生物の培養 & Genome D N A 抽出の前処理

まず、エンテロバクター クロアカエ標準株（ATCC13047）を、定法に従って培養した。この微生物培養液を1. 5ml容量のマикроチューブに1.0ml（OD₆₀₀=0.7）採取し、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。次に、上精を捨てた後、Enzyme Buffer（50mM Tris-HCl：p.H. 8.0、25mM EDTA）300 μ lを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は、再度、遠心分離で菌体を回収した（8500rpm、5min、4℃）。上精を捨てた後、回収された菌体に、以下の酵素溶液を加え、ミキサーを用いて再懸濁した。

【 0 0 3 4 】

Lysozyme	50 μ l	(20 mg/ml in Enzyme Buffer)
N-Acetylmuramidase SG	50 μ l	(0.2 mg/ml in Enzyme Buffer)。

【 0 0 3 5 】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37℃のインキュベーター内で30分間静置し、細胞壁の溶解処理を行った。

【 0 0 3 6 】

[3-2] Genome抽出

以下に示す微生物のGenome DNA抽出は、核酸精製キット（MagExtractor -Genome-：TOYOBO社製）を用いて行った。

【 0 0 3 7 】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750 μ lと磁性ビーズ40 μ lを加え、チューブミキサーを用いて、10分間激しく攪拌した（ステップ1）。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた (ステップ2)。

次に、洗浄液900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁を行った (ステップ3)。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた (ステップ4)。

【0038】

上記ステップ3、4を繰り返して2度目の洗浄を行なう (ステップ5)。その後、70%エタノール900 μ lを加え、ミキサーで5sec程度攪拌して再懸濁した (ステップ6)。

次に、分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた (ステップ7)。

ステップ6、7を繰り返して70%エタノールによる2度目の洗浄 (ステップ8)を行った後、回収された磁性粒子に純水100 μ lを加え、チューブミキサーで10分間攪拌を行った (ステップ9)。

次に分離用スタンド (Magical Trapper) にマイクロチューブをセットし、30sec静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を新しいチューブに回収した。

【0039】

[3-3] 回収したGenome DNAの検査

回収された微生物 (エンテロバクター クロアカエ株) のGenome DNAは、定法に従って、アガロース電気泳動と260/280nmの吸光度測定を行い、その品質 (低分子核酸の混入量、分解の程度) と回収量を検定した。本実施例では、約10 μ gのGenome DNA が回収され、Genome DNAのデグラデーションやrRNAの混入は認められなかった。回収したGenome DNAは、最終濃度50ng/ μ lとなるようにTE緩衝液に溶解し、以下の実施例に使用した。

【 0 0 4 0 】

[4 . N A マイクロアレイの作製]

[4-1] ガラス基板の洗浄

合成石英のガラス基板（サイズ：25mm×75mm×1mm、飯山特殊ガラス社製）を耐熱、耐アルカリ のラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晚洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20分超音波洗浄をおこなった。次に 8 0 ℃ に加熱した 1 N 水酸化ナトリウム水溶液中に10分間基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、DNAチップ用の石英ガラス基板を用意した。

【 0 0 4 1 】

[4-2] 表面処理

シランカップリング剤KBM-603（信越シリコン社製）を、1%の濃度となるように純水中に溶解させ、2時間室温で攪拌した。続いて、先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で表面を洗浄した後、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を 1 2 0 ℃ に加熱したオーブン中で1時間ベークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製のN-マレイミドカプロイロキシスクシイミド（N-(6-Maleimido caproyloxy)succinimido）（以下EMCSと略す）を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1混合溶媒中に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解したEMCS溶液を用意した。

【 0 0 4 2 】

ベークの終了したガラス基板を放冷し、調製したEMCS溶液中に室温で2時間浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基とEMCSのスクシイミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のMCSを溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

【 0 0 4 3 】

[4-3] プローブDNA

実施例1で作製した微生物検出用プローブを純水に溶解し、それぞれ、最終濃度（インク溶解時） $10\mu\text{M}$ となるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

【0044】

[4-4] BJプリンタによるDNA吐出、および基板への結合

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH（川研ファインケミカル社製）1.0wt%を含む水溶液を用意した。続いて、先に用意した7種類のプローブ（表1）の夫々を上記の混合溶媒に規定濃度なるように溶解した。得られたDNA溶液をバブルジェット（登録商標）プリンタ（商品名：BJF-850 キヤノン社製）用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

【0045】

なおここで用いたバブルジェット（登録商標）プリンタは平板への印刷が可能のように改造を施したものである。またこのバブルジェット（登録商標）プリンタは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約 $120\mu\text{m}$ ピッチでスポッティングすることが可能となっている。

【0046】

続いて、この改造バブルジェット（登録商標）プリンタを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、アレイを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30分間加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基と核酸プローブ末端のチオール基とを反応させた。

【0047】

[4-5] 洗浄

30分間の反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液（pH7.0）により表面に残ったDNA溶液を洗い流し、ガラス基板表面に一本鎖DNAが固定した遺伝子チップを得た。

【0048】

[5. 検体の増幅と標識化（PCR増幅&蛍光標識の取り込み）]

検体となる微生物遺伝子の増幅、および、標識化反応を以下に示す。

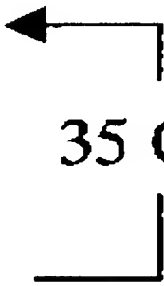
【0049】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 μ l	
Template Genome DNA	2 μ l	(100ng)
Forward Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
Reverse Primer mix	2 μ l	(20pmol/tube each)
Cy-3 dUTP (1mM)	2 μ l	(2nmol/tube)
H ₂ O	17 μ l	
Total	50 μ l	

【0050】

上記組成の反応液を以下のプロトコールに従って、市販のサーマルサイクラーで増幅反応を行った。

【0051】

95°C	10 min.	
92°C	45 sec.	 35 Cycles
55°C	45 sec.	
72°C	45 sec.	
72°C	10 min.	

【0052】

反応終了後、精製用カラム (QIAGEN QIAquick PCR Purification Kit) を用いてPrimerを除去した後、増幅産物の定量を行い、標識化検体とした。

【0053】

[6. ハイブリダイゼーション]

上述の [4. DNAマイクロアレイの作製] で作製した遺伝子チップと [5.

検体の増幅と標識化 (PCR増幅&蛍光標識の取り込み)] で作製した標識化検体を用いて検出反応を行った。

【0054】

[6-1] 遺伝子チップのブロッキング

BSA (牛血清アルブミンFraction V: Sigma社製) を1wt%となるように100mM NaCl/10mM Phosphate Bufferに溶解し、この溶液に [4. DNAマイクロアレイの作製] で作製した遺伝子チップを室温で2時間浸し、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、0.1wt%SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を含む2xSSC溶液 (NaCl 300mM、Sodium Citrate (trisodium citrate dihydrate, $C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$) 30mM、pH 7.0) で洗浄を行った後、純水でリンスしてからスピンドライ装置で水切りを行った。

【0055】

[6-2] ハイブリダイゼーション

水切りした遺伝子チップをハイブリダイゼーション装置 (Genomic Solutions Inc. Hybridization Station) にセットし、以下に示すハイブリダイゼーション溶液、条件でハイブリダイゼーション反応を行った。

【0056】

[6-3] ハイブリダイゼーション溶液

6xSSPE / 10% Form amide / Target (2nd PCR Products 全量)
(6xSSPE: NaCl 900mM、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 60mM、EDTA 6mM、p.H. 7.4)。

[6-4] ハイブリダイゼーション条件

65℃ 3min → 92℃ 2min → 45℃ 3hr → Wash 2xSSC / 0.1% SDS at 25℃ → Wash 2xSSC at 20℃ → (Rinse with H_2O : Manual) → Spin dry (65℃で3分、92度で2分、45℃で3時間ハイブリダイゼーション反応させた後、2xSSC / 0.1% SDS、25℃で洗浄、2xSSC、20℃で洗浄後、純水でリンスしスピンドライした)。

【0057】

[7. 微生物の検出 (蛍光測定)]

上記ハイブリダイゼーション反応終了後の遺伝子チップを遺伝子チップ用蛍光

検出装置 (Axon社製、GenePix 4000B) を用いて蛍光測定を行った。その結果、再現性良く、十分なシグナルで *Enterobacter cloacae* を検出することができた。また、他の菌のプロープに対するハイブリッド体は検出されなかった。

【0058】

以上説明したように、上記実施例によれば、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、肺炎桿菌、緑膿菌、セラチア菌、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、エンテロバクター クロアカエ菌、及びエンテロコッカス・フェカリス菌の10種菌を検出可能なプロープセットを固定したマクロアレイを用いて、感染症起炎菌を同定することが可能になり、微生物由来のDNAプロープの問題を解決した。すなわち、オリゴヌクレオチドプロープは化学的に大量合成が可能であり、精製や濃度のコントロールが可能である。また、細菌の種による分類を目的に、同じ種の菌種は一括検出が可能で、しかも、他の種の細菌は区別して検出できるようなプロープセットが提供できた。

【0059】

また、上記実施形態によれば、感染症起炎菌遺伝子の16s rRNA遺伝子配列を過不足なく検出することにより、該感染症起炎菌の存在を効率良く、また高い精度で判定することができる。

【0060】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明によれば、一度に大量調製することが可能であり、かつ、類似菌種間における菌種の同定が可能な感染症検出用プロープを提供することができる。より具体的には、感染症の複数種の原因菌の種による分類に適した感染症検出用プロープセットを提供することが可能となる。

【0061】

また、これらの類似菌種間の差異がDNAチップ上で精度良く評価可能であるよう、感染症検出用プロープと検体とのハイブリッド体の安定性も考慮したプロープセットを提供することが可能となる。

【0062】

また、これらの感染症検出用プロープと検体との反応を行なう為に、これらの

感染症検出用プローブが固定された担体を提供することができる。

【0 0 6 3】

さらに、検体溶液との反応の過程で、これらの感染症検出用プローブが安定に担体上に固定され、再現性の高い検出結果を得るために、化学的に固定された担体が提供できる。

【配列表】

<110> キヤノン株式会社 CANON, INC.

<120> 感染症起炎菌検出用プローブセット及び担体及び遺伝子検査方法

<160> 150

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gaaccgcatg gttcaaaagt gaaaga

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

cacttataga tggatccgcg ctgc

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

tgcacatctt gacggtacct aatcag

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ccccttagtg ctgcagctaa cg

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

aatacaaagg gcagcgaaac cgc

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ccggtggagt aaccttttag gagct

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

taacctttta ggagctagcc gtcga

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tttaggagct agccgtcgaa ggt

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

tagccgtcga aggtgggaca aat

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

gaacagacga ggagcttgct cc

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tagtgaaaga cggttttgct gtcact

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

taagtaacta tgcacgtctt gacggt

<210> 13

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

gaccctcta gagatagagt tttccc

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

agtaaccatt tggagctagc cgtc

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

gagcttgctc ctctgacgtt agc

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

agccggtgga gtaaccat tt gg

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

ctcttgccat cggatgtgcc ca

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

atacctttgc tcattgacgt tacccg

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

tttgctcatt gacgttacc gcag

<210> 20

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

actggcaagc ttgagtctcg taga

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 21

atacaaagag aagcgacctc gcg

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 22

cggacctcat aaagtgcgtc gtagt

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 23

gcgggggagga agggagtaaa gttaat

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 24

tagcacagag agcttgctct cgg

<210> 25

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

tcatgccatc agatgtgccc aga

<210> 26

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

cggggaggaa ggcgataagg ttaat

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

ttcgattgac gttaccgca gaaga

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 28

ggtctgtcaa gtcggatgtg aaatcc

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 29

gcaggctaga gtctttaga gggg

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 30

tgaggagaa agtgggggat cttc

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 31

tcagatgagc ctaggtcgga ttagc

<210> 32

<211> 24

<212> DNA


<213> Artificial Sequence

<400> 32

gagctagagt acggtagagg gtgg

<210> 33

<211> 25



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 33

gtacggtaga ggggtggtgga atttc

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 34

gaccacctgg actgatactg acac

<210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 35

tggccttgac atgctgagaa ctttc

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 36

ttagttacca gcacctcggg tgg

<210> 37

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 37

tagtctaacc gcaaggggga cg

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 38

tagcacaggg agcttgctcc ct

<210> 39

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 39

aggtggtgag cttaatacgc tcatc

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 40

tcatcaattg acgttactcg cagaag

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 41

actgcatttg aaactggcaa gctaga

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 42

ttatcctttg ttgcagcttc ggcc

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 43

acttttcagcg aggaggaagg tgg

<210> 44

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 44

agtagaacgc tgaaggagga gcttg

<210> 45

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 45

cttgcacac taccagatgg acctg

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 46

tgagagtgga aagttcacac tgtgac

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 47

gctgtggctt aaccatagta ggcttt

<210> 48

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 48

aagcggctct ctggcttgta act

<210> 49

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 49

tagacccttt ccggggttta gtgc

<210> 50

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 50

gacggcaagc taatctctta aagcca

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 51

gcttgggaat ctggcttatg gagg

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 52

tgccatagga tgagcccaag tgg

<210> 53

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 53

cttgggaatg tactgacgct catgtg

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 54

ggattgggct tagagcttgg tgc

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 55

tacagaggga agcgaagctg cg

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 56

ggcgtttacc acggtatgat tcatga

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 57

aatgcctacc aagcctgcga tct

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 58

tatcggaaga tgaaagtgcg ggact

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 59

cagagagctt gctctcgggt ga

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 60

gggaggaagg tgttgtggtt aataac

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 61

ggtgttgtgg ttaataacca cagcaa

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 62

gcggtctgtc aagtcggatg tg

<210> 63

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 63

attcgaaact ggcaggctag agtct

<210> 64

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 64

taaccacagc aattgacgtt acccg

<210> 65

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 65

gcaattgacg ttaccgcag aaga

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 66

ttctttcctc ccgagtgtt gca

<210> 67

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 67

aacacgtggg taacctaccc atcag

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 68

atggcataag agtgaaaggc gctt

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 69

gacccgcggt gcattagcta gt

<210> 70

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 70

ggacgttagt aactgaacgt cccct

<210> 71

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 71

ctcaaccggg gagggtcatt gg

<210> 72

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 72

ttggagggtt tccgcccttc ag

<210> 73

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 73

gcggcgtgcc taatacatgc aag

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 74

gcggcaggcc taacacatgc aag

<210> 75

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 75

gcggcaggct taacacatgc aag

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 76

atccagccgc accttccgat ac

<210> 77

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 77

atccaaccgc aggttcccct ac

<210> 78

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 78

atccagccgc aggttcccct ac

<210> 79

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 79

tctttcactt ttgaaccatg cggttc

<210> 80

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 80

gcagcgcgga tccatctata agtg

<210> 81

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 81

ctgattaggt accgtcaaga tgtgca

<210> 82

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 82

cgtttagctgc agcactaagg gg

<210> 83

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 83

gcggtttcgc tgccctttgt att

<210> 84

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 84

agctcctaaa aggttactcc accgg

<210> 85

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 85

tcgacggcta gtcctaaaa ggtta

<210> 86

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 86

accttcgacg gctagctcct aaa

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 87

atttgtccca ccttcgacgg cta

<210> 88

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 88

ggagcaagct cctcgtctgt tc

<210> 89

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 89

agtgacagca aaaccgtctt tcacta

<210> 90

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 90

accgtcaaga cgtgcatagt tactta

<210> 91

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 91

gggaaaactc tatctctaga ggggtc

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 92

gacggctagc tccaaatggt tact

<210> 93

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 93

gctaacgtca gaggagcaag ctc

<210> 94

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 94

ccaaatggtt actccaccgg ct

<210> 95

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 95

tgggcacatc cgatggcaag ag

<210> 96

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 96

cgggtaacgt caatgagcaa aggtat

<210> 97

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 97

ctgcgggtaa cgtcaatgag caaa

<210> 98

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 98

tctacgagac tcaagcttgc cagt

<210> 99

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 99

cgcgaggtcg cttctctttg tat

<210> 100

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 100

actacgacgc actttatgag gtccg

<210> 101

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 101

attaacttta ctcccttcct ccccg

<210> 102

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 102

ccgagagcaa gctctctgtg cta

<210> 103

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 103

tctgggcaca tctgatggca tga

<210> 104

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 104

attaacctta tcgccttcct ccccg

<210> 105

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 105

tcttctgcgg gtaacgtcaa tcgaa

<210> 106

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 106

ggatttcaca tccgacttga cagacc

<210> 107

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 107

ccccctctaca agactctagc ctgc

<210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 108

gaagatcccc cactttctcc ctca

<210> 109

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 109

gctaataccga cctagggtca tctga

<210> 110

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 110

ccaccctcta ccgtactcta gctc

<210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 111

gaaattccac caccctctac cgtac

<210> 112

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 112

gtgtcagtat cagtccaggt ggtc

<210> 113

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 113

gaaagttctc agcatgtcaa ggcca

<210> 114

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 114

ccacccgagg tgctggtaac taa

<210> 115

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 115

cgtccccctt gcggttagac ta

<210> 116

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 116

agggagcaag ctccctgtgc ta

<210> 117

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 117

gatgagcgta ttaagctcac cacct

<210> 118

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 118

cttctgcgag taacgtcaat tgatga

<210> 119

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 119

tctagcttgc cagtttcaaa tgcagt

<210> 120

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 120

ggccgaagct gcaacaaagg ataa

<210> 121

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 121

ccaccttcct cctcgctgaa agt

<210> 122

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 122

caagctcctc cttcagcgtt ctact

<210> 123

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 123

caggtccatc tggtagtgat gcaag

<210> 124

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 124

gtcacagtgt gaactttcca ctctca

<210> 125

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 125

aaagcctact atggttaagc cacagc

<210> 126

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 126

agttacaagc cagagagccg ctt

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 127

gcactaaacc ccggaaaggg tcta

<210> 128

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 128

tggtttaag agattagctt gccgtc

<210> 129

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 129

cctccataag ccagattccc aagc

<210> 130

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 130

ccacttgggc tcacccctatg gca

<210> 131

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 131

cacatgagcg tcagtacatt cccaag

<210> 132

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 132

gcaccaagct ctaagcccaa tcc

<210> 133

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 133

cgcagcttcg cttccctctg ta

<210> 134

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 134

tcatgaatca taccgtggta aacgcc

<210> 135

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 135

agatcgcagg cttggtaggc att

<210> 136

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 136

agtcccgcac tttcatcttc cgata

<210> 137

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 137

tgcaagcact cgggaggaaa gaa

<210> 138

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 138

ctgatgggta ggttaccac gtgtt

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 139

aagcgccttt cactcttatg ccat

<210> 140

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 140

actagctaata gcaccgcggg tc

<210> 141

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 141

aggggacgtt cagttactaa cgtcc

<210> 142

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 142

ccaatgaccc tccccggttg ag

<210> 143

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 143

ctgaagggcg gaaaccctcc aa

<210> 144

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 144

tcacccgaga gcaagctctc tg

<210> 145

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 145

gttattaacc acaacacctt cctccc

<210> 146

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 146

ttgctgtggt tattaaccac aacacc

<210> 147

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 147

cacatccgac ttgacagacc gc

<210> 148

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 148

agactctagc ctgccagttt cgaat

<210> 149

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 149

cgggtaacgt caattgctgt ggtta

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 150

tcttctgcgg gtaacgtcaa ttgc

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】細菌の属による分類を目的に、同じ属の菌種は一括検出が可能で、しかも、他の属の細菌は区別して検出できるようなプローブを提供する。

【解決手段】感染症起炎菌遺伝子を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブは、下記第1群乃至第10群のうちの一つの群に属する塩基配列の少なくとも一つの塩基配列を含んで構成される。ここで、第1群乃至第10群の塩基配列群は、第1群（配列番号1～9）、第2群（配列番号10～16）、第3群（配列番号17～23）、第4群（配列番号24～29）、第5群（配列番号30～37）、第6群（配列番号38～43）、第7群（配列番号44～50）、第8群（配列番号51～58）、第9群（配列番号59～65）、第10群（配列番号66～72）及びそれらの相補鎖配列である。

特願 2 0 0 3 - 0 9 9 4 5 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 3 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号

氏 名

キャノン株式会社